

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 767 323

⑳ N° d'enregistrement national :

97 10297

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 07 K 7/08, A 61 K 47/48

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 12.08.97.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 19.02.99 Bulletin 99/07.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : SYNT:EM SOCIETE ANONYME —  
FR.

⑦② Inventeur(s) : CALAS BERNARD, GRASSY  
GERARD, CHAVANIEU ALAIN et KACZOREK  
MICHEL.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ.

⑤④ PEPTIDES LINEAIRES DERIVES DE PEPTIDES ANTIBIOTIQUES, LEUR PREPARATION ET LEUR  
UTILISATION POUR VECTORISER DES SUBSTANCES ACTIVES.

⑤⑦ La présente invention concerne des peptides dérivés  
de peptides antibiotiques ou d'analogues de ceux-ci, caracté-  
risés en ce qu'il sont dépourvus de pont disulfure. L'inven-  
tion concerne également l'utilisation de ces peptides  
linéaires pour la vectorisation de substances chimiques ain-  
si que les composés chimiques formés de ces peptides cou-  
plés à au moins une substance active. L'invention concerne  
encore la préparation de ces peptides et de ces composés  
et les compositions les contenant.

FR 2 767 323 - A1



PEPTIDES LINÉAIRES DÉRIVÉS DE PEPTIDES  
ANTIBIOTIQUES, LEUR PRÉPARATION ET LEUR UTILISATION POUR  
VECTORISER DES SUBSTANCES ACTIVES.

5                   La présente invention concerne des peptides  
linéaires dérivés de peptides antibiotiques et leur  
utilisation pour vectoriser des substances actives. Plus  
particulièrement l'invention a pour objet de nouveaux  
composés formés d'un dérivé linéaire d'un peptide  
10 antibiotique lié à au moins une substance active, ainsi  
que la préparation de ces composés et les compositions  
les contenant.

                  A côté de leur système immunitaire  
responsable de mécanismes spécifiques de défense contre  
15 les agents infectieux, les vertébrés possèdent de  
nombreux peptides à activité antimicrobienne (Nicolas,  
P. et al., 1995, Annual Rev. Microbiol. 49, 277-304).  
Ces peptides sont seulement présents chez les  
invertébrés à courte durée de vie et à taux de  
renouvellement élevé, chez lesquels un système  
20 immunitaire à mémoire, long à s'établir et à développer  
une réponse appropriée, serait inadapté.

                  Les peptides antimicrobiens des vertébrés,  
quelque soit leur origine, vertébrés inférieurs ou  
25 supérieurs, tissus myéloïdes ou non myéloïdes, possèdent  
un certain nombre de propriétés communes :

- Une forte basicité due à la présence de  
nombreuses arginines et lysines.

- La capacité de former des structures  
30 amphipatiques. On entend par structure amphipatique des  
structures dans lesquelles les résidus hydrophobes sont  
spatialement séparés des résidus hydrophiles.

- Un très large spectre d'activité. Ils sont  
capables de détruire rapidement des bactéries (Gram+ et  
35 Gram-), des champignons, quelques protozoaires, des  
virus à membrane et même certaines lignées de cellules  
cancéreuses.

Selon leur structure, ils peuvent être classés en trois grandes familles :

5       - Les peptides antibiotiques à hélices  $\alpha$  amphipatiques : cécropines et maganines (Maloy, W. L. et al., 1995, BioPolymer 37, 105-122).

10       - Les peptides antibiotiques à feuillet  $\beta$  réunis par des ponts disulfures : défensines (Lehrer, R. I. et al., 1991, Cell 64:229-230 ; Lehrer, R. I. et al., 1993, Ann. Rev. Immunol. 11:105-128), protégrines (Kokryakov, V. N. et al., 1993, FEBS 337:231-236), tachyplésines (Nakamura, T. et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:16709-16713 ; Miyata, T et al., 1989, J. Biochem. 106:663-668).

15       - les peptides antibiotiques à chaînes déstructurées contenant de nombreux coudes liés à la présence de multiples prolines : bacténécines et PR39 (Frank, R. W. et al., 1991, Eur. J. Biochem. 202, 849-854).

20       Malgré la diversité de leurs séquences, la plupart des peptides antibiotiques agissent par lyse directe de la membrane des cellules pathogènes. Leur nature basique facilite leur interaction avec les phospholipides chargés négativement, et leur caractère amphipatique leur permet ensuite de s'incorporer dans la

25       membrane où ils s'agrègent pour former des pores par lesquels la cellule perd sa substance. Il est généralement admis que leur sélectivité préférentielle pour les cellules procaryotes, est due à la composition particulière de leurs membranes qui contiennent

30       davantage de phospholipides anioniques que celles d'eucaryotes. De plus, les membranes plasmiques de cellules de mammifères contiennent toutes du cholestérol, dont le rôle est d'en moduler la fluidité et qui pourrait gêner l'incorporation des peptides

35       antibiotiques. Toutefois, la spécificité de ces derniers pour les microorganismes est faible si bien qu'ils

présentent une forte cytotoxicité ce qui en limite l'utilisation.

5 La présence de peptides antibiotiques chez les vertébrés et plus particulièrement chez les mammifères soulève de nombreuses questions. Les immunologistes supposent que les composés à activité antimicrobienne non-spécifique que l'on rencontre au niveau des invertébrés constituent un moyen ancestral de  
10 défense qui a ensuite évolué pour conduire aux systèmes à mémoire beaucoup plus complexes. Quel est donc l'intérêt pour les mammifères, par exemple, d'avoir conservé certains peptides à activité antibiotique ? On admet que ces petites molécules toujours présentes dans les fluides biologiques, ou encore séquestrées dans  
15 certaines structures lymphocytaires, pourraient constituer une première ligne de défense en attendant que les anticorps spécifiques soient sécrétés (Nicolas, P. et al., 1995, Annual Rev. Microbiol. 49, 277-304). Ils pourraient également participer au sein des  
20 macrophages, à la destruction des membranes plasmiques des organismes pathogènes.

Quelque soit leur rôle exact, les peptides antibiotiques ont un intérêt considérable du fait de leur large spectre d'action et de la difficulté que les  
25 microorganismes ont à mettre en place des stratégies d'inactivation. De ce fait de très nombreuses recherches sont entreprises pour essayer de trouver de nouvelles molécules et d'obtenir des analogues plus performant que les peptides parents. Il se peut que dans l'avenir, ces  
30 peptides antibiotiques soient appelés à remplacer les antibiotiques issus de bactéries ou de champignons. Ainsi les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les numéros WO95/03325, WO96/37508 et WO97/02287 décrivent une nouvelle classe de peptides  
35 antibiotiques, désignés "protégrines", isolés de leucocytes de porcs ou encore préparés par synthèse chimique ou par génie génétique et présentant des

activités antibactériennes, antivirales et antifongiques.

Actuellement, les peptides antibiotiques à  
feuillets  $\beta$  réunis par des ponts disulfures (défensines,  
5 protégrines, tachyplésines) sont particulièrement  
étudiés étant donné leur puissante activité  
antimicrobienne (bactéries, certains virus, champignons  
et parasites). Dans cette famille, les protégrines et  
les tachyplésines sont certainement les molécules les  
10 plus prometteuses étant donné la simplicité de leur  
structure et la facilité relative de leur synthèse.

On désigne sous le nom de protégrines un  
ensemble de cinq peptides désignés PG-1, PG-2, PG-3,  
PG-4 et PG-5 dont les séquences sont données ci-dessous,  
15 étroitement apparentés et isolés de leucocytes de porc  
(V.N. Kokryakov & col. FEBS lett. 327, 231-236) :

PG-1 : RGGRLCYRRRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>

PG-2 : RGGRLCYRRRFCICV...-NH<sub>2</sub>

PG-3 : RGGGLCYRRRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>

20 PG-4 : RGGRLCYCRGWICFCVGR-NH<sub>2</sub>

PG-5 : RGGRLCYCRPRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>

Les tachyplésines (Tamura, H. et al., 1993,  
Chem. Pharm. Bul. Tokyo 41, 978-980), désignées T1, T2  
et T3 et les polyphémusines (Muta, T., 1994, CIBA  
25 Found. Sym. 186, 160-174), désignées P1 et P2, dont les  
séquences sont données ci-dessous, sont des peptides  
homologues isolés de l'hémolymphe de deux crabes,  
*Tachyplesus tridentatus* pour les tachyplésines T1, T2 et  
T3 et *Limmulus polyphemus* pour les polyphémusines P1 et  
30 P2.

P1 : RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH<sub>2</sub>

P2 : RRWCFRVCYKGFYRKCR-NH<sub>2</sub>

T1 : KWCFRVCYRGICYRRCR-NH<sub>2</sub>

T2 : RWCFRVCYRGICYRKCR-NH<sub>2</sub>

35 T3 : KWCFRVCYRGICYKRCR-NH<sub>2</sub>

Protégrines, tachyplésines et polyphémusines  
contiennent une forte proportion de résidus basiques

(lysines et arginines) et possèdent quatre cystéines qui forment deux ponts disulfures parallèles. Ces trois familles de peptides présentent également des homologies avec certaines défensines et en particulier avec la défensine humaine NP-1 (Kokryakov, V. N. et al., 1993, Febs Let. 327, 231-236).

Tachyplésines et protégrines possèdent une structure tridimensionnelle voisine. Il s'agit d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle stabilisé par les deux ponts disulfures. Ces ponts jouent un rôle important dans l'activité antibactérienne des protégrines et des tachyplésines. Leur suppression, soit en protégeant les groupements SH par des acétamidométhyles, soit en remplaçant les cystéines par des alanines ou des glycines, conduit à des analogues pratiquement dénués d'activité *in vivo* (Lehrer, R. I. et al., 1996, Eur. J. Biochem. 240:352-357).

Comme indiqué précédemment, les protégrines et les tachyplésines ont une importante activité lytique sur les cellules procaryotes. Les travaux de recherche réalisés par la Demanderesse sur la cytotoxicité de ces peptides sur des cellules de mammifère en culture, ont permis de mettre en évidence, avant la mort des cellules, des quantités non-négligeables de protégrines et de tachyplésines dans le cytoplasme desdites cellules. Il a été envisagé que la présence des peptides dans le cytoplasme pouvait résulter d'un transport par le biais de pores, mais ces pores ne sont perméables qu'aux ions et aux petites molécules et leur diamètre est trop petit pour permettre le passage des peptides antibiotiques. Il semblerait que les protégrines et tachyplésines, en plus de perforer la membrane plasmique, soient capables de la traverser.

Il est connu que la cytotoxicité et l'activité antimicrobienne des protégrines et des tachyplésines sont dus à leur capacité de s'agréger à l'intérieur de la membrane pour former des canaux

multimériques (Mangoni, M. et al., 1996, Febs Let. 383, 93-98). La Demanderesse a alors envisagé que cette agrégation soit reliée à la structure tertiaire de ces peptides antibiotiques qui comportent plusieurs résidus cystéines, et des dérivés linéaires des protégrines et des tachyplésines dans lesquels les cystéines sont remplacées par divers acides aminés naturels, ont été synthétisés. Ces peptides ont été couplés, par leur extrémité C-terminale, à une molécule fluorescente ou la biotine et la répartition de ces marqueurs à l'intérieur de la cellule a été observée par microscopie confocale.

Il a ainsi maintenant été trouvé que ces peptides sont non-toxiques et sans activité lytique mais sont par contre capables de traverser rapidement les membranes des cellules de mammifères par un mécanisme passif.

Ces dérivés linéaires des peptides antibiotiques constituent donc un nouveau système de vectorisation de substances actives qui est non toxique.

Par système de vectorisation, on entend selon l'invention, un processus capable de transporter ladite substance active jusqu'à une cible, comme par exemple :

- de faire traverser la membrane cellulaire à une substance active et de permettre la distribution de celle-ci dans le cytoplasme et/ou dans le compartiment nucléaire,

- d'amener une substance active au niveau d'un organe particulier, par exemple de faire franchir à cette substance active la barrière hémato-encéphalique,

- de forcer cette substance active à interagir spécifiquement avec un type cellulaire donné, comme par exemple les hématies.

La présente invention a donc pour objet des peptides dérivés des peptides antibiotiques ou

d'analogues de ceux-ci, caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus de pont disulfure.

L'absence de pont disulfure dans les peptides de l'invention peut être obtenue par tout moyen connu de l'homme du métier. Par exemple :

- en supprimant ou en remplaçant par d'autres acides aminés les résidus de cystéine de la séquence du peptide antibiotique,

- en bloquant les groupes -SH des résidus cystéines de façon à ce qu'ils ne forment pas de pont disulfure,

dès lors bien entendu que le peptide obtenu présente les propriétés de vectorisation sans toxicité pour les cellules décrites précédemment

Ces modifications peuvent être réalisées lors de la préparation des peptides de l'invention, plus particulièrement par synthèse chimique ou par expression d'un gène codant pour ledit peptide, ou directement sur un peptide antibiotique par action d'agents chimiques permettant d'ouvrir et de bloquer les groupes -SH des résidus de cystéine.

Les modifications ci-dessus concernent avantagement tous les résidus de cystéines du peptide antibiotique, mais dès lors que la présence d'un unique résidu de cystéine ne permet pas la formation de pont disulfure, les peptides de l'invention peuvent contenir une seule cystéine. Les peptides antibiotiques naturels présentent généralement 4 ou 6 résidus de cystéine capables de former deux ou trois ponts disulfures, aussi dans les peptides de l'invention, l'une seulement de ces cystéines peut être maintenue et les trois ou cinq autres sont modifiées.

Les peptides d'antibiotiques dont dérivent les peptides de l'invention peuvent être des défensines, des protégrines, des tachyplésines ou leurs analogues, dont les propriétés antibiotiques leur sont conférées



par leur structure tertiaire résultant de la présence de ponts disulfures.

Des peptides préférés selon l'invention répondent à l'une des formules suivantes :

5 BXXBXXXXBBBXXXXXB (I)

BBXXBXXBXXBXXBXXB (II)

qui peuvent être aussi représentées par la formule unique (III) suivante :

B(XB)X(XB)X(XB)XX(XB)B(XB)(XB)X(XB)(XB)XB

10 dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

15 - les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique.

B et X peuvent être des acides aminés naturels ou non, y compris des acides aminés de configuration D. On peut citer comme exemple, les significations de B et X suivantes :

20 - B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

25 - X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine<sup>AcM</sup>, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la  $\beta$ -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la  $\beta$ -homoleucine, 30 l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la

L'invention concerne aussi l'utilisation des peptides ci-dessus pour la vectorisation d'une ou plusieurs substances actives tant pour des applications thérapeutiques que de diagnostic. A titre de substance active, l'invention envisage notamment des protéines ou fragments de protéines, comme des polypeptides ou peptides, des anticorps ou partie d'anticorps, des acides nucléiques et oligonucléotides ou des ribozymes, ou encore, bien entendu des molécules chimiques actives pour le traitement ou la prévention de pathologies humaines ou animales, comme par exemple et de manière non limitative des antitumoraux, des antiviraux, des agents anti-inflammatoires, des agents empêchant la dégradation d'organes et/ou de tissus, etc...

L'invention a donc également pour objet des composés de formule (IV) suivante, ainsi que les compositions les contenant :



- 30 - A représente un peptide linéaire dérivé  
d'un peptide antibiotique conforme à l'invention,  
- Z représente une substance active, comme  
défini ci-dessus,  
- Y représente un agent signal,  
- n est 0 et ou plus, et avantageusement 0  
35 ou 1,  
- m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à  
10 avantageusement jusqu'à 5,

Ainsi, les composés de formule (IV) ci-dessus sont formés à partir d'un peptide de l'invention couplé à une ou plusieurs substances actives, identiques ou différentes, représentées par le groupe (Z) dans la  
5 formule (IV), et éventuellement un ou plusieurs agents de signal, représentés par le groupe (Y) dans la formule (IV), ayant un rôle d'adressage du composé de formule (IV) vers un type cellulaire, un site ou compartiment de la cellule ou un tissu particulier. Plus  
10 particulièrement, l'agent signal (Y) est un oligopeptide ou une protéine, comme un peptide signal, un signal de localisation nucléaire, un fragment d'anticorps, ou une molécule chimique ligand ou anti-ligand d'un récepteur.

Dans une forme toute particulière de  
15 réalisation des composés de formule (IV), le groupe (Y) est fixé au groupe (Z).

Le couplage, symbolisé par les traits horizontaux dans la formule (IV), peut être réalisé par tout moyen de liaison acceptable compte tenu de la  
20 nature chimique, de l'encombrement et du nombre de groupes (Z) et (Y) dans les composés de formule (IV), comme des liaisons covalentes, hydrophobes ou ioniques, clivables ou non-clivables dans les milieux physiologiques. Le couplage peut être effectué en  
25 n'importe quel site du peptide (A), dans lequel des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH<sub>2</sub> sont naturellement présents ou ont été introduits.

L'invention envisage aussi la fixation de plusieurs groupes (Z) sur un même site du peptide (A),  
30 soit directement, si ce site comporte plusieurs groupements fonctionnels, comme dans le cas d'une lysine C- ou N-terminale, soit indirectement via un groupe intermédiaire portant plusieurs groupements réactionnels permettant d'y fixer plusieurs groupes (Z).

35 Les positions de couplage préférées pour la substance active sont au niveau de l'extrémité C-terminale ou bien au niveau des groupements amines

primaires portés par les chaînes latérales des lysines du peptide (A). Dans le cas où l'on utilise l'extrémité C-terminale du peptide (A) pour accrocher la substance active (Z), l'extrémité N-terminale est disponible pour le couplage éventuel à un agent signal (Y) permettant l'adressage du composé de l'invention soit vers le noyau, soit encore vers un type tissulaire particulier.

En effet, par exemple dans le cas du couplage à l'extrémité C-terminale d'un peptide linéaire de l'invention, d'une substance active constituée par un marqueur fluorescent, comme la biotine, ou une molécule médicamenteuse telle que la doxorubicine, le complexe covalent peptide-drogue après administration se répartit dans le cytoplasme de la cellule cible. Il est possible d'amener ce complexe dans le compartiment nucléaire en couplant à l'extrémité N-terminale du peptide une courte séquence basique, par exemple d'environ 7 acides aminés, correspondant à un signal de localisation nucléaire. Dans ces conditions, la biotine ou la doxorubicine se retrouvent dans le noyau de la cellule.

De la même manière, il est possible de vectoriser une drogue vers un type cellulaire donné, en ajoutant à l'extrémité N-terminale du peptide linéaire de l'invention couplé à son extrémité C-terminale à un médicament, une séquence peptidique capable de reconnaître spécifiquement un déterminant présent à la surface de type cellulaire. Ainsi, le pentadecapeptide  $\alpha$ M2 (Swolapenko, G. B. et al., 1995, The Lancet 346, 1662-65) synthétique, fragment d'un anticorps monoclonal, dirigé contre un antigène exprimé par les cellules de cancer du sein (Tumour Associated Antigen Polymorphic Epithelial Mucin), conserve une bonne affinité pour ces cellules. Il est donc possible en associant  $\alpha$ M2 à un ensemble peptide linéaire-médicament, d'amener cet ensemble préférentiellement vers les

cellules qui expriment la caractéristique antigénique liée au cancer mammaire.

Les composés de formule (IV) peuvent être préparés par synthèse chimique ou en utilisant des techniques de biologie moléculaire.

On peut utiliser pour les synthèses chimiques des appareils commerciaux permettant d'incorporer des acides aminés non-naturels, tels que les énantiomères D et des résidus ayant des chaînes latérales ayant des hydrophobicités et des encombrements différents de ceux de leurs homologues naturels. Au cours de la synthèse, il est évidemment possible de réaliser un large éventail de modifications, par exemple introduire sur le N-terminal un lipide (prenyl ou myristyl) de façon à pouvoir ancrer le peptide de l'invention et donc le composé de formule (IV) à une membrane lipidique telle que celle d'un liposome constitué de lipides chargés positivement. Il est également possible de remplacer une ou plusieurs liaisons peptidiques (-CO-NH-) par des structures équivalentes comme -CO-N(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CO-CH<sub>2</sub>-, ou bien d'intercaler des groupes comme -CH<sub>2</sub>-, -NH-, -O-.

On peut également obtenir les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique à partir d'une séquence d'acide nucléique codant pour celui-ci. La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour un peptide linéaire dérivé de peptide antibiotique. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour un composé de formule (IV) ou une partie de celui de nature protéique. Ces séquences d'acides nucléiques peuvent être des ADN ou ARN et être associées à des séquences de contrôle et/ou être insérées dans des vecteurs. Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agir de tout vecteur

comme un plasmide. Ces acides nucléiques et vecteurs sont utiles pour produire les peptides linéaires et les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique dans un hôte cellulaire. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des peptides linéaires ou des composés de formule (IV) peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

A titre d'exemple, un tel procédé de production d'un peptide selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production du peptide,

- à isoler, par tous moyens appropriés les peptides de l'invention.

L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans ce type de procédé peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes. L'invention concerne donc aussi les cellules transformées exprimant les peptides linéaires ou les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique.

L'invention se rapporte aussi :

- aux compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins un composé de formule (IV) éventuellement associé à un véhicule ou support acceptable.

- aux agents de diagnostic constitués d'au moins un composé de formule (IV).

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description qui suit se rapportant à la préparation de composés de formule (IV)

ainsi qu'aux travaux de recherche ayant mené à la mise en évidence des propriétés de vectorisation des peptides linéaires de l'invention dérivés de peptides antibiotiques.

5

Exemple 1 : Fixation de la biotine et de la doxorubicine sur un analogue linéaire de la protégrine.

1) Préparation des peptides linéaires.

10 Les trois peptides de séquences ci-dessous ont été synthétisés :

RGGR $\overline{\text{LXYRRRFXVXVGR-NH}_2}$

RRWXFRVXYRGFX $\overline{\text{YRKR-NH}_2}$

KWXFRVXYRGIX $\overline{\text{YRRXR-NH}_2}$

15 dans lesquels X représente les résidus serine, thréonine ou alanine.

Ces peptides dérivent respectivement des séquences de la protégrine PG-1 de formule :

RGGR $\overline{\text{LCYRRRFCVCVGR-NH}_2}$ ,

20 de la tachyplésine 1 de formule :

KWCFRVCYRGICY $\overline{\text{RRCR-NH}_2}$ ,

de la polyphémusine de formule :

KWXFRVXYRGIX $\overline{\text{YRRXR-NH}_2}$ .

25 Ces trois peptides peuvent être préparés indifféremment soit à partir d'une chimie BOC, soit à partir d'une chimie FMOC, par des procédés classiques de synthèse en phase solide ou homogène.

30 2) Fixation de la biotine sur les peptides linéaires.

Le peptide est synthétisé en phase solide et après incorporation de l'arginine N-terminale on ajoute l'acide 5-aminopentanoïque. Le Fmoc ou le Boc N-terminal est enlevé et on fait réagir sur le peptide toujours accroché à la résine le N-hydroxy succinimide ester de la biotine dans le diméthylformamide. Après 15 heures de réaction à température ambiante, le peptide

5 biotinilé est coupé du support par action de l'acide trifluoroacétique ou de l'acide fluorohydrique selon des protocoles bien établis dans la chimie des peptides. Le peptide est ensuite purifié par chromatographie liquide à haute pression.

3) Fixation de la doxorubicine sur un peptide linéaire.

10 Pour fixer la doxorubicine, on synthétise en phase solide le peptide de formule :



Après clivage du support de purification, le peptide est traité par l'anhydride glutarique en présence de triéthylamine. Le peptide est alors purifié et le groupement -COOH porté par le glutaryl en N-terminal est activé par le mélange diisopropylcarbodiimide et 1-hydroxybenzotriazole. Après deux heures de réaction à température ambiante, de la doxorubicine est ajoutée et le mélange est agité pendant 12 heures à 0°C. L'ensemble peptide-doxorubicine est alors purifié par chromatographie liquide à haute pression.

15

20

25 Exemple 2 : Capacité des peptides linéaires dérivés de peptides antibiotiques à passer les membranes de cellules.

1) Modèles cellulaires.

La capacité des peptides à passer les membranes a été testée sur divers types cellulaires (MCF7, MCF7R, HL60, HL60R, HeLa).

30

Les cellules sont cultivées sur RPMI 1640 (Gibco) auquel on ajoute 10% (v/v) de serum veau foetal, 2mM glutamine and 2mM penicilline/streptomycine, a 37°C. 30 000 cellules sont ensemencées dans des chambres Lab Tek et cultivées pendant 1 jour.

35



2) Traitement par les peptides linéaires-biotine préparés conformément à l'exemple 1 (2).

Les cellules sont incubées dans de l'Opti-Mem (Gibco) pendant une heure avant d'être traitées pendant des temps variables avec les peptides marqués à la biotine.

Ces derniers sont obtenus conformément à l'exemple 1(2) en traitant 1 équivalent de peptide linéaire par 2 équivalents d'ester de N-hydroxysuccinimide de la biotine, puis purifié par chromatographie liquide à haute pression.

Les cellules sont ensuite fixées avec une solution à 3.7% de paraformaldéhyde pendant 5 minutes à 25°C, puis rincées trois fois avec du PBS. Elles sont ensuite perméabilisées par du Triton 0.1% (1 min, température ambiante). Après trois rinçages au PBS, les cellules sont incubées 10 min avec 200 µl d'anticorps TexRed dilué au 300<sup>ème</sup> et rincées trois fois au PBS. Les lames sont enfin montées avec une solution Mowiol-Dabco et observées au photomicroscope Axiophot.

3) Traitement par les peptides linéaires-doxorubicine préparés conformément à l'exemple 1 (3).

Les cellules sont incubées pendant 15 minutes, puis rincées avec du PBS et ensuite la doxorubicine présente dans la cellule est dosée par chromatographie.

4) Résultats.

30

a) Parmi les peptides étudiés, ceux qui passent le plus facilement les membranes sont ceux répondant aux formules suivantes :

RXXRXUXURRRXUXUXXR-NH<sub>2</sub> (V)

RRXUXRXUXRXXUXRRUR-NH<sub>2</sub> (VI)

dans lesquelles

- U représente la sérine ou la thréonine,

- R représente l'arginine, et

- les groupes X identiques ou différents représentent un acide aminés naturel ou non (y compris acides aminés de configuration D) aliphatiques ou aromatiques, comme la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine<sup>AcM</sup>, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la  $\beta$ -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la  $\beta$ -homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

b) Les résultats des expériences menées avec la doxorucine montrent une augmentation significative de la concentration plasmatique et nucléaire en doxorubicine lorsque celle-ci est couplée au peptide linéaire de l'invention par rapport à l'utilisation de doxorubicine seule.

c) Les expériences avec la biotine ont été effectuées plus particulièrement sur des cellules MCF7 traitées à différents temps par un complexe biotine-peptide de l'invention de formule :

biotine-RGGRLSYSRRRFSVSVGR-NH<sub>2</sub>

Ces travaux ont donné lieu à des clichés (non représentés) :

- Contrôle dans lequel la cellule a été traitée avec la biotine seule.

- Traitement de la cellule pendant 2 minutes avec un complexe biotine-peptide linéaire de l'invention.

- Traitement de la cellule pendant 30 minutes avec un complexe biotine-peptide linéaire de l'invention.

5 On observe dans ces clichés que la biotine seule ne rentre pas dans la cellule et s'accumule faiblement autour de celle-ci. A l'inverse, avec le complexe de l'invention, on constate que la biotine est entraînée rapidement par le peptide linéaire de l'invention à l'intérieur de la cellule où elle est  
10 présente dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule.

Dans les séquences peptidiques rapportées ci-dessus, les acides aminés sont représentés par leur  
15 code à une lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

	A	Ala	alanine
	C	Cys	cystéine
20	D	Asp	acide aspartique
	E	Glu	acide glutamique
	F	Phe	phénylalanine
	G	Gly	glycine
	H	His	histidine
25	I	Ile	isoleucine
	K	Lys	lysine
	L	Leu	leucine
	M	Met	méthionine
	N	Asn	asparagine
30	P	Pro	proline
	Q	Gln	glutamine
	R	Arg	arginine
	S	Ser	sérine
	T	Thr	thréonine
35	V	Val	valine
	W	Trp	tryptophane
	Y	Tyr	tyrosine

## REVENDECATIONS

5 1) Peptide dérivé d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de pont disulfure.

10 2) Peptide dérivé d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci, caractérisé en ce que tous les résidus cystéines, éventuellement sauf un, sont supprimés, remplacés par un autre résidu d'acide ou bloqués au niveau de leur groupe SH.

15 3) Peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des formules suivantes :

BXXBXXXXBBBXXXXXXB (I)

BBXXBXXBXBXBXBXB (II)

dans lesquelles :

20 - les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique.

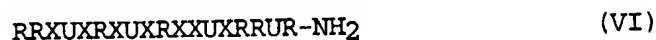
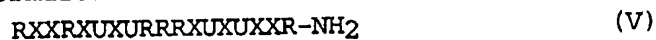
25

30 4) Peptide selon la revendication 3, caractérisé en ce que les groupes B sont choisis parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

35 5) Peptide selon l'une des revendications 3 à 4, caractérisé en ce que les groupes X sont choisis parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine<sup>Acm</sup>, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine,

1'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline,  
 1'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib,  
 la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-  
 bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-  
 5 chlorophénylalanine, la  $\beta$ -cyclohexylalanine, la 3,4-  
 dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine,  
 1'homoleucine, la  $\beta$ -homoleucine, l'homophénylalanine, la  
 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-  
 10 naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-  
 nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-  
 pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

6) Peptide selon l'une quelconque des  
 revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il répond à  
 15 l'une des formules suivantes :



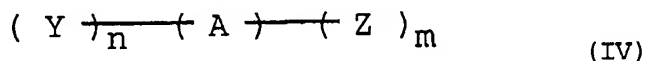
dans lesquelles

- U représente la sérine ou la thréonine,
- 20 - R représente l'arginine, et
- les groupes X identiques ou différents  
 représentent un acide aminés naturel ou non (y compris  
 acides aminés de configuration D) aliphatiques ou  
 aromatiques, comme la glycine, l'alanine, la valine, la  
 25 norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la  
 cystéine<sup>Acm</sup>, la penicillamine, la méthionine, la serine,  
 la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la  
 phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine,  
 la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane  
 30 carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique,  
 la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-  
 chlorophénylalanine, la  $\beta$ -cyclohexylalanine, la 3,4-  
 dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine,  
 1'homoleucine, la  $\beta$ -homoleucine, l'homophénylalanine, la  
 35 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-  
 naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-

nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

5 7) Utilisation d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci dépourvu de pont disulfure, pour vectoriser des substances actives dans un organisme.

10 8) Composé de formule (IV) suivante :



dans laquelle

- A représente un peptide linéaire dérivé d'un peptide antibiotique conforme à l'invention,
- 15 - Z représente une substance active,
- Y représente un agent signal,
- n est 0 et ou plus, et avantageusement 0 ou 1,
- m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 20 10, avantageusement jusqu'à 5,

9) Composé de formule (IV) telle que définie à la revendication 8, caractérisé en ce que le couplage entre le peptide linéaire (A) et le groupe (Z) ou les 25 groupes (Z) et (Y) est réalisé par une ou plusieurs liaisons covalentes, hydrophobes ou ioniques.

10) Composé de formule (IV) telle que définie à l'une quelconque des revendications 8 à 9, caractérisé en ce que l'une au moins des substances 30 actives (Z) est fixée par une liaison covalente soit à l'extrémité C-terminale, soit au niveau des groupements amines primaires portés par les chaînes latérales des lysines, du peptide linéaire (A).

35 11) Composé de formule (IV) telle que définie à l'une quelconque des revendications 8 à 10,

11) Composé de formule (IV) telle que  
définie à l'une quelconque des revendications 8 à 10,  
caractérisé en ce qu'au moins un agent signal (Y), s'il  
est présent, est fixé par une liaison covalente à  
5 l'extrémité N-terminale du peptide linéaire (A).

12) Composition pharmaceutique caractérisé  
en ce qu'elle comprend comme principe actif au moins un  
composé de formule (IV) selon l'une quelconque des  
10 revendications 8 à 11.

13) Un agent de diagnostic constitué d'au  
moins un composé de formule (IV) selon l'une quelconque  
des revendications 8 à 11.  
15

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 547236  
FR 9710297

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	QU, XIAO-DAN ET AL: "Protegrin structure and activity against Neisseria gonorrhoeae" INFECT. IMMUN. (1997), 65(2), 636-639 CODEN: INFIBR;ISSN: 0019-9567, 1997, XP002065780 * page 638, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1; tableau 1 *	1-5,12
X	MASUDA, MASAO ET AL: "A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusin II)" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODEN: BBRCA9;ISSN: 0006-291X, 1992, XP002065781 * voir composé T10 en fig. 1 * * page 848, dernier alinéa - page 849, alinéa 2; figure 1 *	1,2,12
X	TAMAMURA, HIROKAZU ET AL: "Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs" CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODEN: CPBTAL;ISSN: 0009-2363, 1993, XP002047195 * page 978, colonne de droite, alinéa 2 - page 979, colonne de droite, alinéa 1; figure 1 *	1,2,12
X	WO 97 18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I ;UNIV CALIFORNIA (US)) 29 mai 1997 * voir composé PC-8 * * revendications; exemple 12; tableau 17 *	1-5,12
A	WO 94 18323 A (XOMA CORP) 18 août 1994 * page 3, ligne 12 - page 4, ligne 26 *	1-6,12
	-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 mai 1998		Fuhr, C
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1  
EPO FORM 1503 02.82 (P04C13)



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 90 04408 A (MAGAININ SCIENCES INC) 3 mai 1990 * revendications; exemples * -----	1-7,12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 mai 1998		Fuhr, C
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		